

ЛОКАЛИЗАЦИЯ АКТИНА В ЯДРАХ ДВУХКЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШИ

© Н. А. Боголюбова,¹ И. О. Боголюбова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹электронный адрес: nataly_bogoly@mail.ru

В настоящей работе доимплантационные зародыши мыши были использованы как новая модель для исследования локализации актина в ядре и идентификации тех форм, в которых он в ядре присутствует. Для изучения паттерна распределения актина в ядрах двухклеточных зародышей мыши впервые применили комплексный подход, сочетающий использование флуоресцентно меченных фаллоидина и ДНКазы I и непрямой иммунофлуоресценции. Установлено присутствие в ядрах агрегатов мономерного актина и двух олигомерных форм актина, различающихся по характеру внутриядерного распределения. Олигомерная форма актина, выявляемая антителами к C-концевому домену, ассоциирована с областями конденсированного хроматина, а также с хромосомами метафазной пластинки и хроматином второго полярного тельца. Мономерный актин и его олигомерная форма, выявляемая антителами к N-концевому домену, напротив, обнаруживаются в местах локализации диспергированного хроматина.

Ключевые слова: доимплантационные зародыши мыши, клеточное ядро, ядерный актин, ДНКазы I, фаллоидин, непрямая иммунофлуоресценция, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

Принятые сокращения: ВПТ — второе полярное тельце.

Сообщения о наличии актина в ядрах клеток животных (Clark, Rosenbaum, 1979; Nakayasu, Ueda, 1983; Парфенов, Галактионов, 1987) долгое время ставились научным сообществом под сомнение. Однако после идентификации мономерного актина как ключевого компонента ремоделирующих хроматин-комплексов (Paroulas et al., 1998; Zhao et al., 1998; Shen et al., 2000), а также обнаружения в ядре актиноподобных и актинсвязывающих белков (см. обзор: Blessing et al., 2004) ситуация принципиально изменилась. Стало очевидным, что актин не только присутствует в клеточном ядре, но и выполняет там целый ряд функций, не ограничиваясь участием в образовании ремоделирующих хроматин-комплексов. К числу важнейших функций ядерного актина можно отнести, во-первых, его участие в процессе транскрипции (см. обзор: Miralles, Visa, 2006), в котором он, видимо, играет как каталитическую, так и структурную роль, и, во-вторых, формирование и поддержание структуры ядра (Krauss et al., 2002; Bohnsack et al., 2006).

В настоящее время, когда существование внутриядерного актина является общепризнанным фактом (Gall, 2006), в центре внимания исследователей находится вопрос не только о его функциональном значении, но также о формах, в которых он присутствует в ядре (Pederson, 2008).

Использование нескольких вариантов моноклональных антител, способных связываться с различными эпитопами молекулы актина (Milankov, De Boni, 1993; Gonsior et al., 1999), показало, что антитела по-разному распознают ядерный и цитоплазматический актин. Был сделан вывод о существовании заметных конформационных различий между актином ядра и цитоплазмы (Gonsior et al.,

1999). Результаты экспериментов с антителами 2G2, которые были выработаны против комплекса актин—профилин и не могли визуализировать классические актиновые филаменты, позволили предположить, что актин в ядрах соматических клеток находится преимущественно в мономерной форме (Gonsior et al., 1999). Помимо этого, он, видимо, формирует новые, ранее не наблюдавшиеся олигомерные структуры, которые не распознаются фаллоидином (de Lanerolle et al., 2005).

Следует отметить, что подавляющее большинство работ, связанных с ядерным актином, было выполнено в бесклеточных системах и на культивируемых соматических клетках. Существуют лишь отдельные исследования, выполненные с использованием эмбриональных объектов, таких как ооциты шпорцевой лягушки (Johnson et al., 2003; Bohnsack et al., 2006), крысы (Funaki et al., 1995), а также зиготы мыши (Nguyen et al., 1998). Данные о наличии и форме актина в ядрах эмбрионов млекопитающих на ранних стадиях дробления практически отсутствуют и только иногда встречаются в работах, посвященных смежным вопросам, например актинсвязывающим белкам (Rawe et al., 2006).

Эмбрионы мыши, в частности двухклеточные зародыши, являются перспективным объектом для изучения распределения и возможных функций внутриядерного актина. Ядра ранних эмбрионов млекопитающих являются чрезвычайно динамичной структурой, находящейся в процессе становления дефинитивной структурно-функциональной компартиментализации (Паткин, 1980; Fakan, Odartchenko, 1980; Geuskens, Alexandre, 1984; Боголюбова, Парфенов, 2000, 2002; Zatsepina et al., 2003). Для ядер ранних эмбрионов млекопитающих характерно значи-

тельное изменение транскрипционной активности хромосом и ядрышек (Geuskens, Alexandre, 1984; Latham, 1999; Ma et al., 2001).

В силу некоторой асинхронности развития бластомеров в составе эмбрионов в одной серии экспериментов у зародышей можно наблюдать не только интерфазные ядра, но и хромосомы на стадии метафазы митоза. Кроме того, при исследовании двухклеточных эмбрионов также можно видеть второе полярное тельце (ВПТ), которое представляет собой продукт завершения второго деления мейоза. Хромосомы ВПТ блокированы на стадии интерфазы (Баранов, Кузнецова, 2007). К концу двухклеточной стадии ВПТ находится в процессе деградации и его хроматин пикнотизирован. Таким образом, использование в качестве объекта исследования двухклеточных зародышей мыши предоставляет замечательную возможность для сравнительного анализа распределения актина в ядрах с различным функциональным статусом.

Целью данной работы являлся сравнительный анализ внутриядерного распределения актина, выявляемого с помощью флуоресцентно меченных фаллоидина и ДНКазы I, а также двух видов антител — к С-концевому и к N-концевому доменам молекулы актина.

Материал и методика

Получение эмбрионов. Работа выполнена на мышах BALB/c из питомника РАМН «Рапполово» (Санкт-Петербург). Для получения животных с датированным сроком беременности у самок индуцировали овуляцию последовательными однократными инъекциями сывороточного (Folligon, Intervet, Голландия) и хорионического (Chorulon, Intervet, Голландия) гонадотропинов по 5—10 МЕ на животное с интервалом между инъекциями 44—48 ч. После инъекции хорионического гонадотропина самок подсаживали к плодовитым самцам и произошедшее спаривание контролировали по наличию копулятивных пробок. Возраст зародышей отсчитывали от времени инъекции хорионического гонадотропина. Эмбрионы извлекали из яйцеводов через 46 и 48 ч после инъекции хорионического гонадотропина в среду F 10, содержащую NEPES (25 мМ). Для дальнейшей работы использовали зародыши, не имевшие видимых морфологических дефектов.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Использовали поликлональные кроличьи антитела, выработанные против фрагмента С-концевого домена молекулы актина (А 2066, Sigma, США) при разведении 1 : 100, либо поликлональные кроличьи антитела, выработанные против фрагмента N-концевого домена молекулы актина (А 2103, Sigma, США) при разведении 1 : 200. В качестве вторых антител использовали козы антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с FITC (Sigma, США).

Для прямого определения неполимеризованного актина использовали конъюгат Alexa Fluor 488—ДНКазы I (D 12371, Molecular Probes, США), который, по информации фирмы-производителя, специфически связывается с мономерным актином. Концентрация данного маркера составляла 9 мкг/мл. Для выявления фибриллярного актина использовали TRITC-фаллоидин (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл.

Для идентификации актина методом непрямой иммунофлуоресценции зародыши фик-

сировали в течение 40—60 мин в 4%-ном растворе параформальдегида на PBS при комнатной температуре, после чего отмывали в трех порциях PBS. Далее проводили пермеабиллизацию клеток в 0.5%-ном растворе Тритона X-100 на PBS в течение 10 мин с последующей трехкратной отмывкой в PBS и 10-минутной инкубацией в 10%-ном растворе эмбриональной сыворотки на PBS для предотвращения неспецифического связывания антител. Затем эмбрионы помещали в раствор первых антител и инкубировали при 4 °С не менее 12 ч. После отмывки в PBS и 10-минутной инкубации в эмбриональной сыворотке зародыши помещали в раствор вторых антител на 60 мин при комнатной температуре. Далее следовали отмывка зародышей в PBS и выявление ДНК при помощи окрашивания TO-PRO-3 (Molecular Probes, США) в концентрации 1 мкг/мл. После этого эмбрионы заключали в среду VectaShield (Vector Laboratories, США). Анализ препаратов проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TSC SL. В качестве контроля использовали эмбрионы, обработанные только вторыми антителами.

Прямое выявление актина. Мономерный актин выявляли, инкубируя предварительно фиксированный и пермеабиллизированный материал в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе конъюгата Alexa Fluor 488—ДНКазы I. Затем зародыши трижды отмывали в PBS и монтировали на предметные стекла для последующего наблюдения. Фибриллярный актин выявляли при помощи TRITC-фаллоидина, в раствор которого эмбрионы помещали на 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации актина использовали конфокальный микроскоп Leica TSC SL.

Результаты

Ядра бластомеров двухклеточных зародышей. В результате выявления актина с помощью антител, выработанных против фрагмента С-концевого домена молекулы актина, наблюдается четко выраженное свечение ядер по всему их объему, за исключением проядрышек (рис. 1, а). При этом интенсивность мечения ядер всегда выше, чем цитоплазмы, хотя может варьировать в достаточно широких пределах. Флуоресцентное окрашивание ядра формируется за счет мелкозернистого мечения нуклеоплазмы, на фоне которого можно наблюдать отдельные зоны более интенсивного свечения. Помимо этого, существуют небольшие участки, где свечение отсутствует. Обращает на себя внимание интенсивная флуоресценция, ассоциированная с периферией проядрышек.

Использование ядерного красителя TO-PRO-3 позволило показать, что хроматин в ядрах диспергирован по всему объему нуклеоплазмы, на этом фоне наблюдаются более крупные агрегаты конденсированного хроматина, а также конденсация хроматина по периферии проядрышек (рис. 1, б, д, з; 2, б). Одновременное выявление актина, меченного с помощью антител к С-концевому домену, и хроматина показало практически полную их солокализацию (рис. 1, в), что свидетельствует о том, что молекулы актина, выявляемые с использованием антител к С-концевому домену актина, локализуются прежде всего в местах расположения высококонденсированного хроматина, в том числе вокруг проядрышек.

После окрашивания двухклеточных эмбрионов мыши с помощью антител к N-концевому домену молекулы ак-

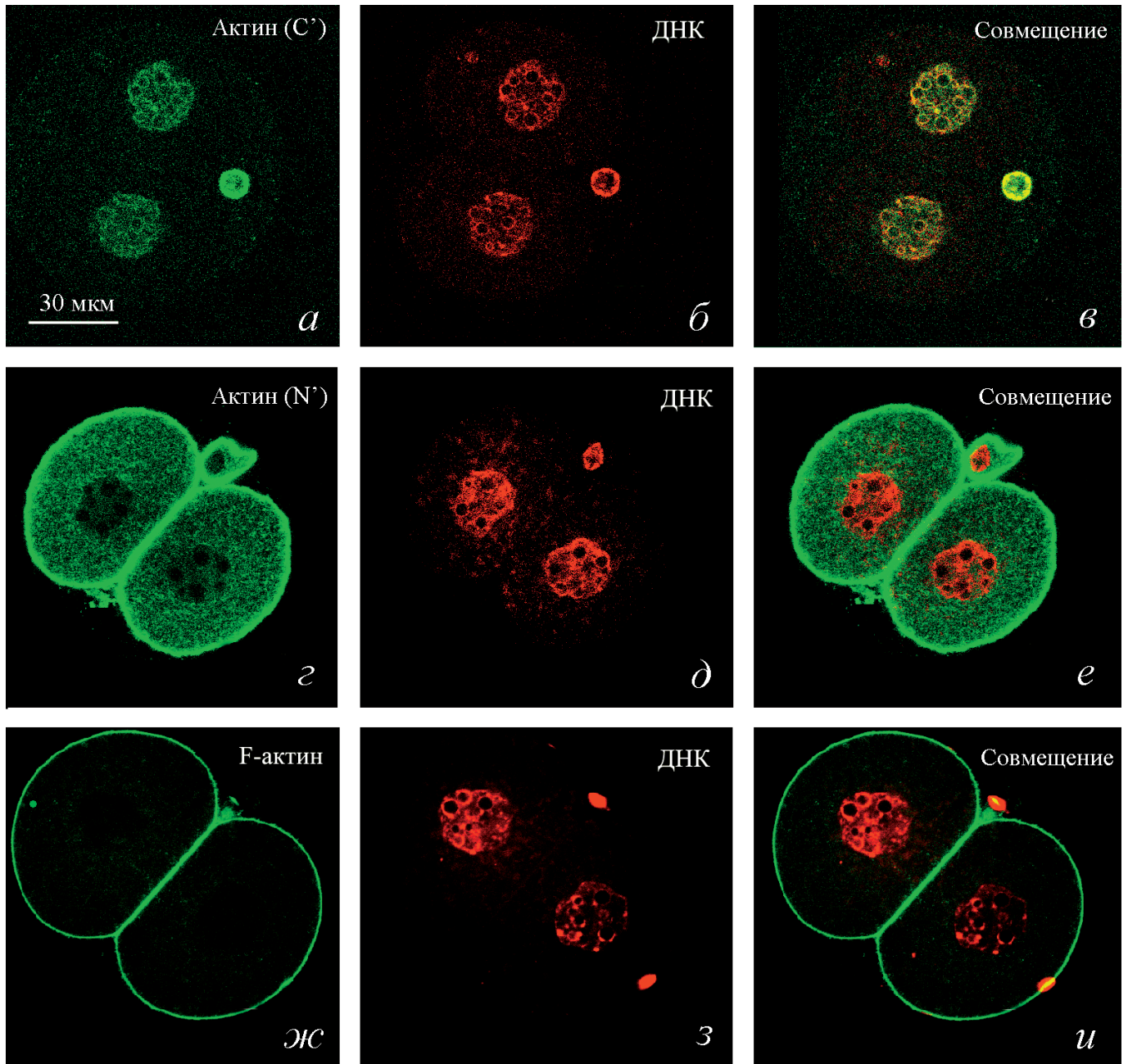


Рис. 1. Актин в ядрах эмбрионов мыши на поздней двухклеточной стадии.

а, з — непрямое флуоресцентное мечение антителами соответственно к С- (актин (C')) и к N-терминальному (актин (N')) доменам молекулы актина; *ж* — окрашивание TRITC-фаллоидином; *б, д, з* — ДНК, окрашенная с помощью TO-PRO-3; *в, е, и* — совмещенные изображения. Об. 63×.

тина наблюдается совершенно иной характер распределения иммунофлуоресцентного мечения. Прежде всего, в данном случае выявляется отчетливо выраженное свечение кортикальной зоны цитоплазмы, никогда не наблюдаемое при использовании антител к С-концевому домену молекулы актина. При использовании антител к N-концевому домену молекулы актина, как и в предыдущем случае, также наблюдается флуоресцентное свечение ядер, хотя его интенсивность всегда ниже, чем интенсивность мечения цитоплазмы (рис. 1, з). Ассоциация мечения с периферической зоной проядрышек отсутствует, сами проядрышки, как и в предыдущем случае, остаются неокрашенными. Как и в случае использования антител к С-концевому домену актина, на фоне диффузного свечения

нуклеоплазмы можно наблюдать отдельные более крупные светящиеся точки. В то же время одновременное выявление актина, меченного антителами к N-концевому домену актина, и хроматина показало отсутствие локализации флуоресцентных меток в ядрах бластомеров. Таким образом, актин при использовании антител к N-концевому домену молекулы выявляется прежде всего в зонах локализации малоконденсированного хроматина (рис. 1, е).

При использовании TRITC-фаллоидина наибольшая интенсивность свечения была характерна для кортикальной зоны цитоплазмы и области межбластомерного контакта. В местах расположения ядер наблюдалось чрезвычайно слабое равномерное свечение, не позволяющее ви-

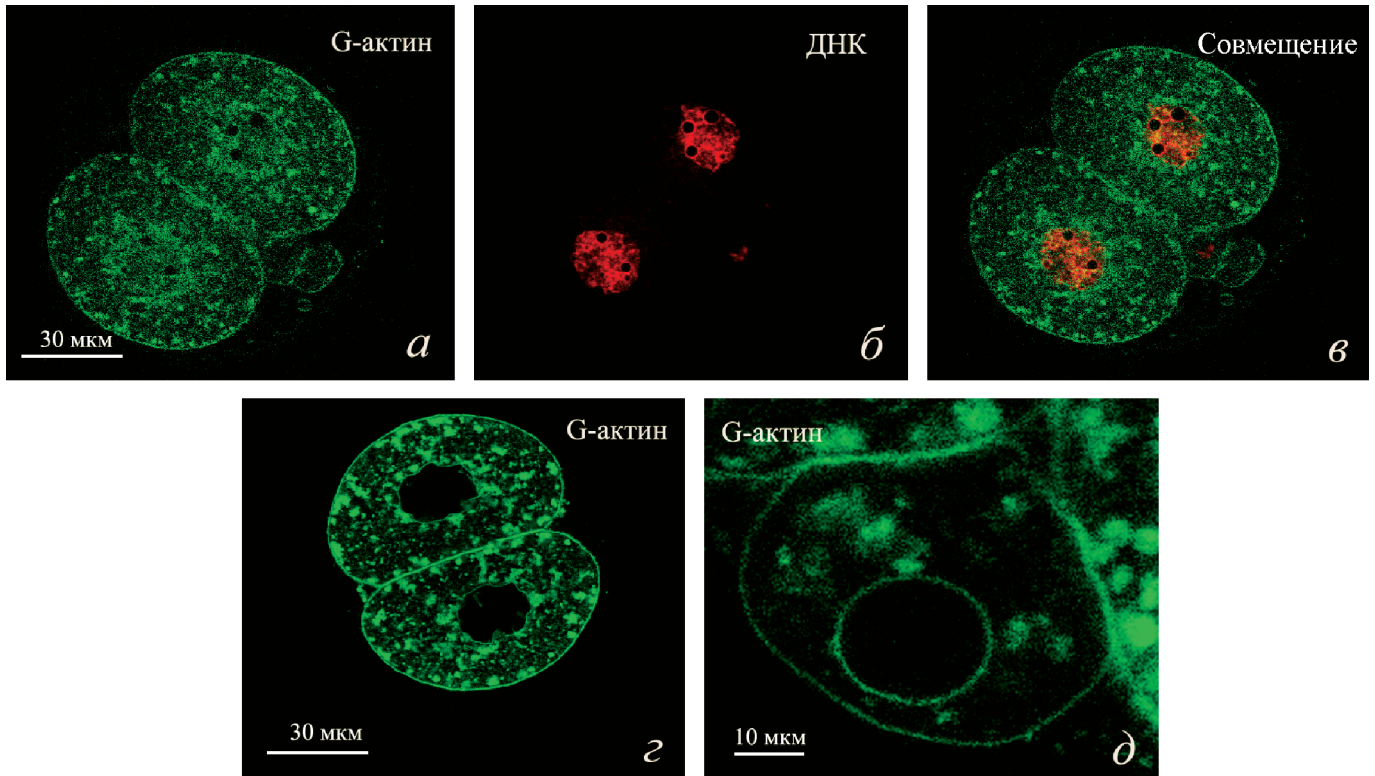


Рис. 2. Выявление мономерного актина в бластомерах (а, е) и во втором направлении тельце (д) двухклеточных зародышей мыши с использованием ДНКазы I, конъюгированной с Alexa Fluor 488.

б — окраска ДНК с помощью TO-PRO-3, в — совмещенное изображение. Об. 63×.

зуализировать какие-либо внутриядерные структуры (рис. 1, ж).

Окрашивание эмбрионов с использованием ДНКазы I, конъюгированной с Alexa Fluor 488, выявило два варианта мечения ядер. Для большинства зародышей было характерно свечение, распределенное по всему объему ядер, за исключением мест локализации проядрышек, на фоне которого можно наблюдать более яркие участки флуоресценции (рис. 2, а). Однако у некоторых зародышей свечение в местах локализации ядер полностью отсутствовало (рис. 2, е). Одновременная визуализация мономерного актина и хроматина показала полное отсутствие их солокализации (рис. 2, в).

Метафазная пластинка второго деления дробления и ядро второго полярного тельца. При использовании антител против фрагмента С-концевого домена молекулы актина в зоне расположения метафазных пластинок наблюдается ярко выраженная флуоресценция. Отчетливо видно свечение отдельных хромосом (рис. 3, а, в). В ядре ВПТ также наблюдается ассоциация актина с хроматином. Двойное мечение актина и хроматина демонстрирует полную солокализацию флуоресцентных меток (рис. 1, в).

При использовании антител к фрагменту N-концевого домена молекулы актина мечение хромосом метафазной пластинки, отчетливо выявляемых при окрашивании ДНК (рис. 3, д), а также хроматина полярного тельца отсутствует (рис. 3, з, е). Наблюдается только незначительное усиление свечения цитоплазмы вокруг пластинок.

У зародышей, окрашенных TRITC-фаллоидином, полностью отсутствовало какое-либо флуоресцентное свечение, ассоциированное с метафазными хромосомами

(рис. 3, б, в). В зоне расположения хроматина полярного тельца присутствовало слабое равномерное свечение, подобное свечению в местах локализации ядер бластомеров при аналогичном окрашивании.

Отсутствие солокализации флуоресцентной метки с хроматином полярного тельца было обнаружено у зародышей, окрашенных конъюгатом Alexa Fluor 488—ДНКазы I (рис. 2, д).

Обсуждение

Известно, что актин присутствует в цитоплазме в мономерной (G-актин) и полимерной, представленной фибриллярным актином (F-актин), формах (Steinmetz et al., 1997; Aguda et al., 2005). В клеточном ядре обнаружен мономерный актин (Olave et al., 2002), но предполагают, что ядерный актин может также существовать в форме коротких филаментов или в иных, характерных для ядра олигомерных формах (Bettinger et al., 2004).

Использованные нами в работе диагностические маркеры и их различные сочетания позволяют выявить ядерный актин в различных его формах. На основании полученных нами данных можно с уверенностью говорить об отсутствии в ядрах бластомеров зародышей фибриллярного актина, выявляемого с помощью флуоресцентно меченного фаллоидина. При использовании данного маркера нам не удалось обнаружить выраженное мечение ни в интерфазных ядрах эмбрионов, ни в зоне расположения конденсированных метафазных хромосом, ни в ядре ВПТ. Это подтверждает существующее мнение о том, что появление таких филаментов в ядре происходит лишь под воз-

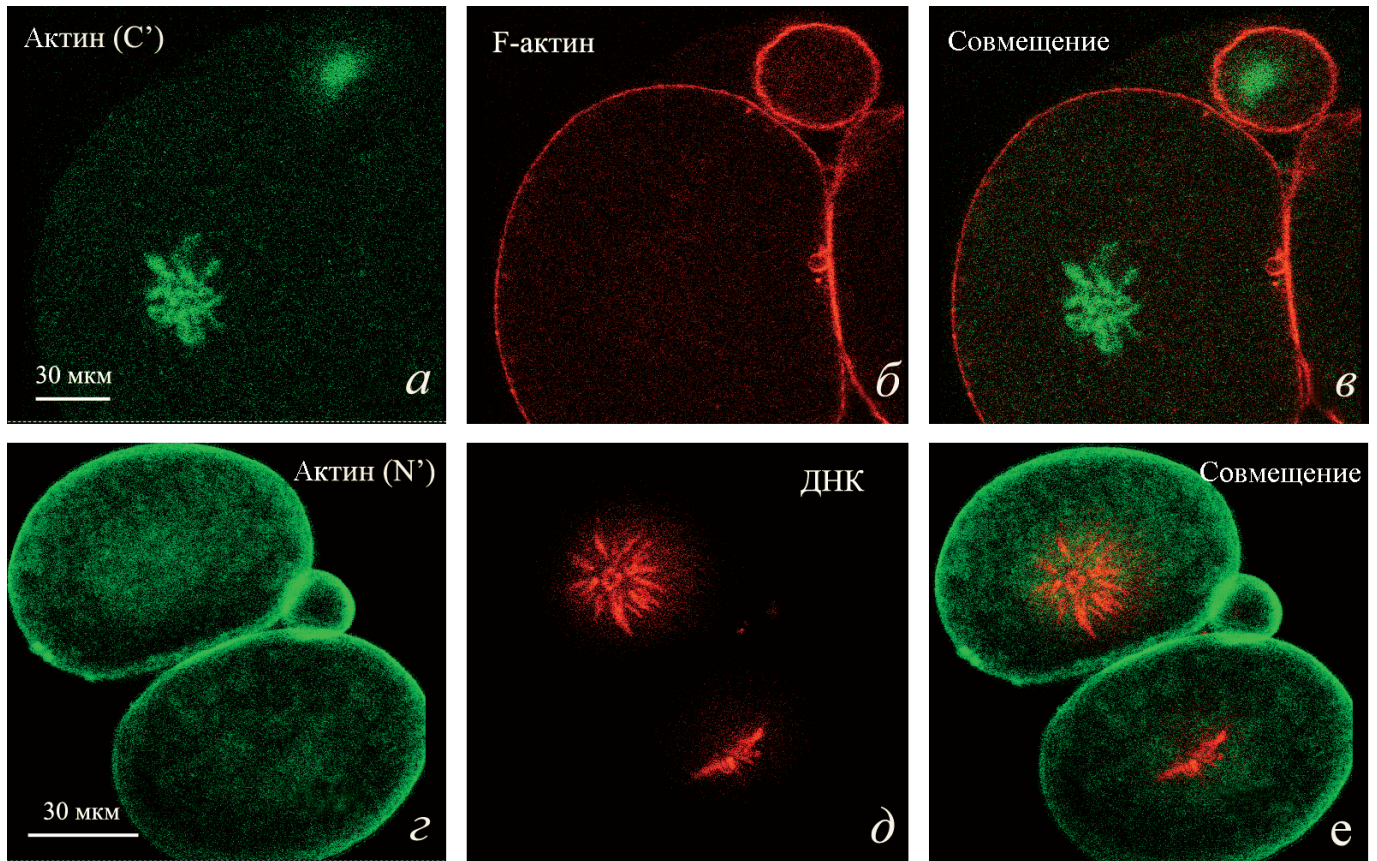


Рис. 3. Актин в митотически делящихся бластомерах эмбрионов мыши.

a, z — не прямое флуоресцентное мечение с помощью антител соответственно к С- и N-концевому доменам молекулы актина; *б* — окрашивание с помощью TRITC-фаллоидина; *д* — окрашивание ДНК с помощью TO-PRO-3; *в, e* — совмещенные изображения. Об. 63×.

действием повреждающих факторов, например теплового шока (Ohta et al., 1989).

Присутствие агрегатов мономерного актина мы наблюдали в ядрах только у части исследованных зародышей. Можно предположить, что такая гетерогенность связана либо с различиями в жизнеспособности эмбрионов, либо с небольшими различиями в их возрасте. Более вероятным, на наш взгляд, кажется последнее предположение. Возможно, отсутствие мономерного актина в ядрах связано с подготовкой к следующему делению, которое часть зародышей пройдет раньше остальных. Отсутствие сококализации ДНКазы I и TO-PRO-3 позволяет предположить, что в ядрах эмбрионов агрегаты мономерного актина ассоциированы с областями транскрипционно активного деконденсированного хроматина. Такой результат хорошо согласуется с опубликованными данными об участии G-актина в обеспечении транскрипции (Miralles, Visa, 2006). В то же время, учитывая специфику объекта, можно предполагать, что значительная часть выявляемого в ядрах ранних эмбрионов мономерного актина является остаточным пулом молекул, синтезированных ооцитами в процессе их роста.

Следует отметить, что при использовании антител к N-концевому домену и к С-концевому домену молекулы актина мы наблюдали различный характер флуоресцентного мечения как ядер, так и цитоплазмы бластомеров. В частности, антитела к N-концевому домену интенсивно связывались с кортикальной зоной цитоплазмы, а общий уровень мечения цитоплазмы всегда был выше уровня ме-

чения ядер. Антитела к С-концевому домену никогда не метили кортикальную область, а интенсивность мечения ядер всегда была выше интенсивности мечения цитоплазмы. Свойство выявлять в клетках преимущественно ядерный актин было ранее описано для некоторых антител к актину (Milankov, De Boni, 1993; Gonsior et al., 1999). Данный феномен объясняли существенными конформационными различиями между ядерным и цитоплазматическим актином и вследствие этого различной степенью доступности определенного эпитопа для связывания с антителами.

Параллельные исследования с использованием TRITC-фаллоидина позволяют заключить, что антитела к С-домену актина, использованные в данной работе, в отличие от антител к N-домену не в состоянии взаимодействовать с классическими актиновыми филаментами, в которых С-концевой домен недоступен для непосредственного взаимодействия с антителами.

Сравнительный анализ распределения флуоресценции после использования двух видов антител и ДНКазы I позволяет сделать вывод о том, что антитела к N-концевому домену и к С-концевому домену молекулы актина выявляют в ядрах бластомеров прежде всего олигомеры актина, что соответствует сложившимся представлениям об основных формах внутриядерного актина (Bettinger et al., 2004; Pedersen, 2008). Помимо этого, антитела к N-концевому домену, по-видимому, в состоянии выявлять также мономерный актин.

Интересно, что актин, выявляемый с помощью антител к разным эпитопам, находится в различных простран-

ственных и функциональных отношениях с хроматином. Антитела к С-домену выявляют актин, ассоциированный с конденсированным хроматином, тогда как антитела к N-домену прежде всего выявляют актин в области диспергированного хроматина. Особенно наглядно это видно на примере конденсированного хроматина, окружающего проядрышки, который всегда интенсивно метится антителами к С-домену и никогда антителами к N-домену. Эта же тенденция прослеживается при мечении антителами хромосом в составе метафазной пластинки и хроматина ВПТ. Только антитела к С-домену метят конденсированные хромосомы и глыбки пикнотического хроматина.

Данные наблюдения позволяют предположить, что использованные антитела выявляют молекулы актина, несущие различную функциональную нагрузку. Антитела к N-домену прежде всего выявляют молекулы, тем или иным образом участвующие в процессе транскрипции, тогда как антитела к С-домену связываются с молекулами актина, прежде всего обеспечивающими пространственную организацию хроматина. Различный характер связывания использованных антител может объясняться тем, что молекулы актина в зависимости от выполняемой ими функции могут взаимодействовать с разными группами белков и в результате тот или иной эпитоп может быть недоступным для антител.

Исходя из полученных данных мы полагаем, что на светооптическом уровне в ядрах поздних двухклеточных эмбрионов можно наблюдать три различные функциональные формы актина. Агрегаты мономерного актина и олигомерная форма актина, которую выявляют антитела к N-концевому домену молекулы актина, ассоциированы с активно транскрибируемой ДНК, где, по-видимому, могут участвовать в осуществлении транскрипции. Кроме того, данная олигомерная форма актина может выполнять в ядре структурную роль, являясь компонентом нуклеоскелета. Ранее актин был обнаружен в составе нуклеоскелета соматических клеток (Shumaker et al., 2003). Другая олигомерная форма актина ассоциирована преимущественно с конденсированным транскрипционно неактивным или малоактивным хроматином, где, возможно, выполняет функцию пространственной организации ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00685) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Баранов В. С., Кузнецова Т. В. 2007. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб.: Изд-во Н-Л. 439 с.
- Боголюбова И. О., Парфенов В. Н. 2000. Факторы сплайсинга пре-мРНК в ядрах двухклеточных зародышей мышей. Цитология. 42 (3): 884—890.
- Боголюбова И. О., Парфенов В. Н. 2002. Распределение РНК-полимеразы II в ядрах ранних мышинных эмбрионов. Цитология. 44 (2): 175—180.
- Парфенов В. Н., Галактионов К. И. 1987. Внутриядерные актиновые микрофиламенты в ооцитах травяной лягушки. Цитология. 29(2): 142—149.
- Паткин Е. Л. 1980. Исследование структурного гетерохроматина на начальных стадиях развития зародышей мыши. Онтогенез. 11(1): 49—55.
- Aguda A. H., Burtnick L. D., Robinson R. C. 2005. The state of the filament. EMBO Rep. 6: 220—226.
- Bettinger B. T., Gilbert D. M., Amberg D. C. 2004. Actin up in the nucleus. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5: 410—415.
- Blessing C. A., Uginova G. T., Goodson H. V. 2004. Actin and ARPs: action in the nucleus. Trends Cell Biol. 14: 435—442.
- Bohnsack M. T., Stuvén T., Kuhn C., Cordes V. C., Golrich D. 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. Nat. Cell Biol. 8: 257—263.
- Clark T. G., Rosenbaum J. L. 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. Cell. 18: 1101—1108.
- Fakan S., Odartchenko N. 1980. Ultrastructural organization of the cell nucleus in early mouse embryos. Biol. Cell. (Biologie Cellulaire). 37: 211—218.
- Funaki K., Katsumoto T., Iino A. 1995. Immunocytochemical localization of actin in the nucleolus of rat oocytes. Biol. Cell. 84: 139—146.
- Gall J. G. 2006. Exporting actin. Nat. Cell Biol. 8: 205—207.
- Geuskens M., Alexandre H. 1984. Ultrastructural and autoradiographic studies of nucleolar development and rDNA transcription in preimplantation mouse embryos. Cell. Differ. 14: 125—134.
- Gonsior S. M., Platz S., Buchmeier S., Scheer U., Jockusch B. M., Hinssen H. 1999. Conformation difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. J. Cell Sci. 112: 797—809.
- Johnson N., Krebs M., Boudreau R., Giorgi G. et al. 2003. Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. Differentiation. 71: 414—424.
- Krauss S. W., Heald R., Lee G., Nunomura W., Gimm J. A., Mohandas N., Chasis J. A. 2002. Two distinct domains of protein 4.1 critical for assembly of functional nuclei *in vitro*. J. Biol. Chem. 277: 44 339—44 346.
- Lanerolle P., de, Johnson T., Hofmann W. 2005. Actin and myosin I in the nucleus: what next? Nat. Struct. Mol. Biol. 12: 742—746.
- Latham K. E. 1999. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. Int. Rev. Cytol. 193: 71—124.
- Ma J., Svoboda P., Shultz R. M., Stein P. 2001. Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo: global activation and repression of gene expression. Biol. Reprod. 64: 1713—1721.
- Milankov K., De Boni U. 1993. Cytochemical localization of actin and myosin aggregates in interphase nuclei *in situ*. Exp. Cell Res. 209: 189—195.
- Miralles F., Visa N. 2006. Actin in transcription and transcription regulation. Curr. Opin. Cell Biol. 18: 261—266.
- Nakayasu H., Ueda K. 1983. Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. Exp. Cell Res. 143: 55—62.
- Nguyen E., Besombes D., Debey P. 1998. Immunofluorescent localization of actin in relation to transcription sites in mouse nuclei. Mol. Reprod. Develop. 50: 263—272.
- Ohta Y., Nishida E., Sakai H., Miyamoto E. 1989. Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock induced nuclear accumulation of cofilin. J. Biol. Chem. 264: 16 143—16 148.
- Olave J. A., Reck-Peterson S. L., Crabtree G. R. 2002. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodelling. Ann. Rev. Biochem. 71: 755—781.
- Papoulias O., Beck S. J., Moseley S. L., McCallum C. M., Sar-te M., Shearn A., Tamkun J. W. 1998. The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. Development. 125: 3955—3966.
- Pedersen T. 2008. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? J. Cell Biol. 180: 1061—1064.
- Rawe V. Y., Payne C., Schatten G. 2006. Profilin and actin-related proteins regulate microfilament dynamics during early mammalian embryogenesis. Hum. Reprod. 21: 1143—1153.
- Shen X., Mizuguchi G., Hamiche A., Wu C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and RNA processing. Nature. 406: 541—544.
- Shumaker D. K., Kuczumarski E. R., Goldman R. D. 2003. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. Curr. Opin. Cell Biol. 15: 358—366.

Steinmetz M.O., Stoffler D., Hoenger A. 1997. Actin: from cell biology to atomic detail. *J. Struct. Biol.* 119 : 295—320.

Zatsepina O., Baly C., Chebrout M., Debey P. 2003. The step-wise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the Cajal (coiled) body. *Develop. Biol.* 253 : 66—83.

Zhao K., Wang W., Rando O. J., Xue Y., Swiderek K., Kuo A., Cradtree G. R. 1998. Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T-lymphocyte receptor signalling. *Cell.* 95: 625—636.

Поступила 18 III 2009

ACTIN LOCALIZATION IN THE NUCLEI OF TWO-CELL MOUSE EMBRYOS

N. A. Bogolyubova,¹ I. O. Bogolyubova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: nataly_bogoly@mail.ru

In this study, preimplantation mouse embryos were used as a new model for investigation of actin distribution in the nuclei and identification of functional forms of intranuclear actin. Combination of direct detection of actin by fluorescent-conjugated falloidin and DNase I with the method of indirect immunofluorescence was applied as an integrated approach to study localization of actin in the nuclei of two-cell mouse embryos. Monomeric actin and two oligomeric forms of actin were detected in the nuclei, and each of these forms demonstrated its own pattern of distribution. Oligomeric actin recognized by antibodies to C-terminal domain of actin was associated with condensed chromatin as well as with metaphase chromosomes and chromatin of second polar body. Monomeric actin and another oligomeric form recognized by antibodies to N-terminal domain were revealed in the area of dispersed chromatin localization.

Key words: preimplantation mouse embryos, cell nucleus, nuclear actin, falloidin, DNase I, indirect immunofluorescence, laser confocal scanning microscopy.